

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **61-246124**

(43)Date of publication of application : **01.11.1986**

(51)Int.Cl. **A61K 31/35**

// C07D311/30

(21)Application number : **60-089770** (71)Applicant : **YAMANOUCHI
PHARMACEUT CO LTD
OGAWARA HIROSHI**

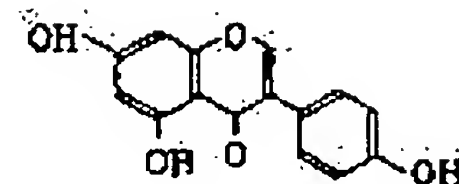
(22)Date of filing : **24.04.1985** (72)Inventor : **OGAWARA HIROSHI
WATANABE SHUNICHI**

(54) **CARCINOSTATIC AGENT**

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a carcinostatic agent containing 5,7,4'-trihydroxyisoflavone as an active component and having tumor cell proliferation inhibiting activity and DNA-synthesis inhibiting activity.

CONSTITUTION: The objective agent contains 5,7,4'-trihydroxyisoflavone (general name: genistein) as an active component. Genistein is a compound separated from a certain kind of clover (*Trifolium subterraneum* L.) and is known to have weak estrogen activity. It has been found newly that the compound is effective to inhibit the proliferation of tumor cell, the synthesis of DNA and the activity of tyrosine-specific phosphorylase. Coupled with the low acute toxicity, the compound is useful as a carcinostatic agent for the remedy of human and animal cancer, the remedy for diseases caused by the metastasis of cancer and the prevention of relapse of cancer. It is applied at a rate of usually 200W1,000mg daily in 1W4 divided doses.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-246124

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)11月1日

A 61 K 31/35
// C 07 D 311/30

ADU

6640-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 制癌剤

⑯ 特 願 昭60-89770

⑰ 出 願 昭60(1985)4月24日

⑱ 発 明 者 小 河 原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

⑲ 発 明 者 渡 辺 俊 一 大宮市大字蓮沼869-3

⑳ 出 願 人 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目5番地1

㉑ 出 願 人 小 河 原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

㉒ 代 理 人 弁理士 藤野 清也 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

制癌剤

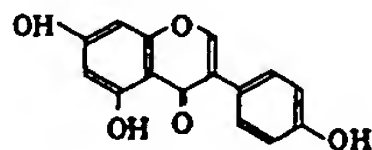
2. 特許請求の範囲

5, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン(ゲニステイン)を有効成分とする制癌剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は 式



で示される 5, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン(一般名 ゲニステイン)を有効成分とする制癌剤に関する。

(従来の技術)

ゲニステインは、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー(Journal of the Chemical Society) 3447頁 1951年に記載されている公知化合物で

ある。同文献によれば、ゲニステインはある種のクローバー(*Trifolium subterraneum* L.) から単離された化合物で、弱いエストロゲン作用を有することが報告されている。しかし、制癌作用については全く報告されていない。

(発明の作用および効果)

本発明者等は、土壌より分離されたシュードモナス属に属する微生物の発酵生産物中に制癌作用を有する物質を認め、さらに探索した結果、この物質がゲニステインであることをつきとめ発明を完成した。

以下、本発明の化合物の制癌作用および毒性等を説明する。

① 腫瘍細胞増殖阻止作用及びDNA合成阻止作用

ゲニステインの制癌作用を、以下の実験的腫瘍細胞の増殖阻止及びDNA合成阻止試験により調べた。

(i) ラウス肉腫ウイルスによるラット形質転換細胞(RSV-3Y1細胞)に対する増殖阻止

試験

(ロ) ヒト上皮性癌細胞 (A 431 細胞) に対する
増殖阻止試験

(イ) SV 40 ウイルスによるラット形質転換細胞 (SV 40 - 3Y1 細胞) に対する増殖阻止
試験

(ニ) マウス肥満細胞腫 (P 815 細胞) に対する
DNA 合成阻止試験

(ホ) マウス胸腺 (EL - 4 細胞) に対する DNA
合成阻止試験

試験方法および結果

上記 (イ), (ロ) および (ニ) の試験方法は以下の通りである。

(イ) RSV - 3Y1 細胞, (ロ) A 431 細胞または (ニ) SV 40 - 3Y1 細胞を 2 % 牛胎児血清 (ギブコ (Gibco) 社製) 及び各種濃度のゲニステインを含むダルベッコ (Dulbecco) の MEM (日本水産 (株) 製) 培地中で培養した。ゲニステインの濃度は無添加, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 4 通りとした。1, 2, 3 および 4 日後

5 % CO_2 培養器で 24 時間培養後, [^3H] チミジン (Thymidine) (アマシヤム・ジャパン (株) 製) を 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$ 添加し, 更に 18 時間培養した。ウェルごとに細胞をグラスファイバーフィルター (ワットマン (Whatman) GF/C) 上に取り, フィルターは乾燥後シンチレーションバイアルに入れ, トルエンシンチレーターを加え, 液体シンチレーションカウンターで [^3H] チミジン (Thymidine) の取り込みを測定した。結果を第 2 図に示す。

第 2 図に見られるように, 培養液中に, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のゲニステインが存在すると P 815 細胞では約 50 % チミジンの取り込みが抑えられ, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度では P 815 細胞, EL - 4 細胞ともにチミジンの取り込みが完全に阻止される。

② チロシン特異的リン酸化酵素活性の阻止作用

ゲニステインの各種酵素活性阻止作用を, 以下の 3 種 (a ~ c) のチロシン特異的プロテインキナーゼ, 2 種 (d, e) のセリン, スレ

にトリバンプルーを用いて 1 ディッシュ中の生細胞数を計測した。結果を第 1 図 (イ) ~ (ロ) に示す。

第 1 図にみられるようにゲニステインは 1 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の添加量で細胞の増殖阻止作用が認められ, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では顕著な増殖阻止作用を示す。

上記 (ニ) および (ホ) の試験方法は以下の通りである。

(ニ) P 815 細胞または (ホ) EL - 4 細胞を 2 % の 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間非働化处理牛胎児血清 (フローラボラトリーズ (Flow Laboratories) 社製) と 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (エッセクス日本 (株) 製) を添加した RPMI 1640 培地 (日本水産 (株) 製) に懸濁し, 最終細胞濃度を 2×10^3 細胞/ ml とした。96 ウェル平底マイクロプレート (住友ベークライト (株) 製) に, この細胞懸濁液を 200 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 入れ, ゲニステインを最終濃度が, 無添加, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えた。このプレートを 37 $^{\circ}\text{C}$

オニンプロテインキナーゼ, 及びその他の酵素 (f ~ h) について測定した。

- (a) ラウス肉腫ウイルス由来 (Src 遺伝子 pp 60^{src}) チロシン特異的リン酸化酵素
- (b) ヒト上皮性癌細胞増殖因子受容体 (EGF レセプター, A 431 細胞) チロシン特異的リン酸化酵素
- (c) ネコ肉腫ウイルス由来 (fes 遺伝子, pp 110^{fos}) チロシン特異的リン酸化酵素
- (d) c - AMP 依存性プロテインキナーゼ
- (e) ホスホリラーゼキナーゼ
- (f) ホスホジエステラーゼ
- (g) Na^+ , K^+ - ATPase
- (h) 5' -ヌクレオチダーゼ

この中, (a) ~ (c) は癌遺伝子由来のチロシン特異的リン酸化酵素であり, (d) (e) はセリン, スレオニンのプロテインキナーゼである。

ゲニステインによるこれらの酵素活性阻止作用の測定方法および結果を次に示す。

測定方法

(a) ラウス肉腫ウイルス由来 (Src 遺伝子 pp60^{src})

チロシン特異的リン酸化酵素活性の測定法
(エム, エス・コレット, アール, エル・
エリクソン: プロシーディング・オブ・ザ・
ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・
オブ・ザ・ユーエスエー 75 巻 2021~
2024 頁 1978 年参照)

ラウス肉腫ウイルス (RSV) でトランスフ
ォームした 3Y1 細胞 (ラット胎児腎由来線
維芽細胞) を培養し, 洗浄後それに RIPA
バッファー [0.5% NP40, 0.1% ソディウム
デオキシコレート (sodium deoxycholate), 50mM
トリス-塩酸 (Tris-HCl) pH 7.2, 1mM フ
ェニルメチルスルホニルフルオライド
(phenylmethyl sulfonyl fluoride) (PMSF), 0.15
M NaCl] を加え, 0℃ 30 分間放置すること
により可溶化する。これを 10 万×g 20 分
間遠心することにより得た上清に, RSV を
接種して担癌としたウサギより得た抗血清

ン, ジイ・カーペンター, エル・キング;
ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミ
ストリー 255 巻, 4834~4842 頁 1980 年
参照)

EGF レセプターを多量に含むことの知ら
れているヒト上皮性癌細胞 (A431 細胞)
より調整した細胞膜を酵素源として用いた。
50 μl 中に, 20mM Pipes-NaOH pH 7.2, 10
mMMgCl₂, 3mM MnCl₂, 1mM DTT, 10 μM [γ-
³²P] ATP (2mCi/mmol), A431 細胞細胞膜
(タンパク量 10 μg) 及びグニステインを含
む反応液を 5 分間反応したのち, 反応を停止
させ, 反応液を 8% ポリアクリルアミドゲ
ル電気泳動-オートラジオグラフィで解析
して, 分子量 17 万の EGF レセプターのリ
ン酸化の有無を調べる。さらにその EGF レ
セプターを切り出し, 液体シンチレーシ
ョンカウンターで放射能を測定することによ
り, リン酸化の程度を定量した。

・ A431 細胞からの細胞膜調整法

を加え 0℃ で 30 分~1 時間インキュベート
し, pp60^{src} と抗体を反応させる。免疫複合
物をプロテイン A-セファローズ 4B (protein
A-Sepharose-4B) (ファルマシア社製) と
混合することにより集めてから RIPA バッ
ファーで洗う。得られた pp60^{src}-抗体-プロ
テイン A-セファローズ 4B 複合体を, 20
mM Pipes-NaOH pH 7.2, 5mMMgCl₂, 1mM
DTT, 10 μM [γ-³²P] ATP (2mCi/mmol) 中で
30℃ 5 分間反応してプロテインキナーゼ反
応を行った後 SDS を含む反応停止液を加え,
3 分間煮沸し反応を止める。反応液を 8%
SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動
し, オートラジオグラフィののち, 切り出
した pp60^{src} の放射能を液体シンチレーシ
ョンカウンターにより計測し, リン酸化反
応を定量した。

(b) ヒト上皮性癌細胞増殖因子受容体 (EGF
レセプター, A431 細胞) チロシン特異的
リン酸化酵素活性の測定法 (エス・コウエ

7% 牛胎児血清 (ギブコ社製) を含むダ
ルベッコの MEM (日本水産物製) 培地で
培養した A431 細胞を集め, コーエンらの
方法 (スタンレイ・コーエン, ヒロシ・
ウシロ, クリスタ・ストジェック, ミカエ
ル・チンカーズ: ジャーナル オブ バイオ
ロジカル ケミストリー 257 巻 1523-1531
頁 1982 年参照) により細胞膜小胞を調整
した。

(c) ネコ肉腫ウイルス由来 (fes 遺伝子, pp110^{fes})
チロシン特異的リン酸化酵素活性の測定法
(アール・エー・フェルドマン, ティー・
ハナフサ, エッチ・ハナフサ; セル 22 巻
757~765 頁 1980 年参照)

ネコ肉腫ウイルスによりトランスフ
ォームしたラット 3Y1 細胞, 及びこの細胞を接
種して担癌としたフィッシャーラットの血
清を用いて, pp60^{src} の場合と同様にして
免疫沈降した pp110^{fes} のプロテインキナー
ゼ活性を測定した。

(d) c-AMP依存性プロテインキナーゼの活性測定法

ウサギ筋肉より調整した c-AMP依存性プロテインキナーゼ (タンパク量 4 μ g) (シグマ (Sigma) 社製) を 50mM HEPES - NaOH pH 7.5, 10mM MgCl₂, 4 μ M [γ -³²P]ATP (2mCi/mmol), 6 μ g/ml ヒストン type II A (シグマ社製), 10 μ M c-AMP 及び ゲニステインを含む反応液 50 μ l 中で 30℃ 5 分間反応した。2 × 2 cm のワットマンロ紙 P 81 にスポットし, ロ紙を 50mM NaCl で 5 分間ずつ 4 回洗浄後, さらにアセトンで 5 分間洗浄し, 液体シンチレーションカウンタで放射能を計測した。

(e) ホスホリラーゼキナーゼ活性の測定法

50 μ l 中に 40mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) pH 7.4, 100 μ M CaCl₂, 1mM DTT, 10mM MgCl₂, 10 μ M [γ -³²P]ATP (2mCi/mmol), 10 μ g ホスホリラーゼ b (phosphorylase-b) (シグマ社製), ウサギ筋肉ホスホリラーゼキナー

ゼは, 上清液に 1% トリトン X-100 5 μ l, 精製水 350 μ l, 2.5% モリブデン酸アンモニウムを含む 5N-硫酸水溶液 50 μ l を加え 20 分間放置後, 660nm の吸光度を測定することにより定量した。

(g) Na⁺, K⁺-ATPase 活性の測定法

50 μ l 中に, 50mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) pH 7.5, 60mM NaCl, 25mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 3mM ATP, イヌ腎臓より調整した Na⁺, K⁺-ATPase (タンパク量 560 ng) 及び ゲニステインを含む反応液を 37℃ 30 分間反応後, ホスホジエステラーゼと同様にして反応の結果生じたリンを定量した。

○ Na⁺, K⁺-ATPase の調製

Na⁺, K⁺-ATPase は, カワムラらの方法 (カワムラ, オータ, ナガノ: ジャーナルオブバイオケミストリー 87 巻 1327-1333 頁 1980 年参照) イヌ腎臓外髄 (outer medulla) を 50mM イミダゾール pH 7.4, 0.25

ゼ (phosphorylase kinase) (タンパク量 2 μ g) (シグマ社製) 及び ゲニステインを含む反応液を 30℃ 5 分間反応後, SDS を含む反応停止液を加え 100℃ で 2 分間煮沸し反応をとめた。ホスホリラーゼ b のリン酸化は反応液を 8% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動-オートラジオグラフィ後, 切り出したホスホリラーゼ b を液体シンチレーションカウンタで測定することにより定量した。

(f) ホスホジエステラーゼ活性の測定

50 μ l 中に, 50mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) pH 7.5, 8mM MgCl₂, 0.8mM EDTA, 0.02mM DTT, 5mM c-AMP (シグマ社製), ウシ心臓ホスホジエステラーゼ (タンパク量 10 μ g) (シグマ社製), 及び ゲニステインを含む反応液を 37℃ 30 分間反応する。

10% TCA を 50 μ l 加えて反応をとめ, 5,000 rpm 10 分間遠心して得た上清 90 μ l を用いてリンの定量を行う。リンの呈色反応

M スクロース, 1mM EDTA, 0.1mM ATP を含むバッファー中でポリトロン (polytron) (キネマティカ (Kinematica) 社製) で破壊後超遠心することにより得られたミクロソーム画分を SDS で抽出することにより調製した。

(h) 5'-ヌクレオチダーゼ活性の測定法

50 μ l 中に 55mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) pH 8.5, 5.5mM MgCl₂, 1.1mM ATP, 10mM 酒石酸ナトリウムカリウム塩, 5'-ヌクレオチダーゼ (蛇毒) (シグマ社製) 及び ゲニステインを含む反応液を, 37℃ 3 分間反応後, ホスホジエステラーゼと同様にして反応産物のリン酸を定量した。

結 果

ゲニステインの各酵素に対する活性阻止作用

酵 素 系	ID ₅₀ (μ g/ml)
(a) pp60 ^{src} プロテインキナーゼ	0.8
(b) EGF レセプタープロテインキナーゼ	0.7
(c) pp110 ^{fos} プロテインキナーゼ	6.5

(d) c-AMP 依存性プロテインキナーゼ	>100
(e) ホスホリラーゼ キナーゼ	>100
(f) ホスホジエステラーゼ	>100
(g) Na^+ , K^+ -ATPase	>100
(h) 5'-ヌクレオチダーゼ	>100

LD₅₀: 50% 阻止量

以上の結果に示されるように、ゲニステインは癌遺伝子由来のチロシン特異的リン酸化酵素活性を特異的に阻止する。

チロシン特異的リン酸化酵素は、癌細胞の増殖に関与すると考えられているから、この酵素活性の特異的阻止作用が認められたことは、ゲニステインの制癌作用を裏付けるものである。

- ③ C57BL/6 系マウスを用い、ゲニステインを腹腔内に注射して急性毒性を調べた。LD₅₀は500mg/kg以上であった。

上記腫瘍細胞増殖阻止作用、DNA 阻止作用およびチロシン特異的リン酸化酵素活性の

また、免疫療法剤としては、たとえば、クレスチン、BCG、ビシバニール、レンチナン、インターフェロン、インターロイキン等が挙げられる。これらの薬剤と併用する場合の投与量はゲニステイン1に対し、併用薬剤0.001~10程度が適当である。

ゲニステインの投与は、経口剤（錠剤、カプセル剤、液剤）あるいは非経口剤（直腸投与製剤、注射剤、ベレット）の製剤形態で行なわれる。これ等の製剤は、任意慣用の製剤用担体あるいは賦形剤を通常の方法によって配合された組成物として調製される。この際使用される担体あるいは賦形剤は、一般的に用いられるもので良く、たとえば、錠剤の場合、水、ブドウ糖、乳糖、アラビアゴム、ゼラチン、マンニトール、でん粉ペースト、マグネシウムトリシリケート、メルク、トウモロコシでん粉、グラチン、コロイドシリカ、馬鈴薯でん粉、尿素等が利用できる。また液剤は、水性または油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリ

阻止作用の試験結果より、ゲニステインはすぐれた制癌作用を有しており、しかも急性毒性の結果も低いので、ヒトおよび動物の癌の治療、癌の転移に伴う疾患の治療および再発の予防のための制癌剤として有用である。

ゲニステインの臨床投与量は活性成分として、通常成人1日当り、200~1,000mgであり、これを1~4回に分けて投与する。投与量は患者の状態や年齢等、個々の場合に応じて適宜調節される。

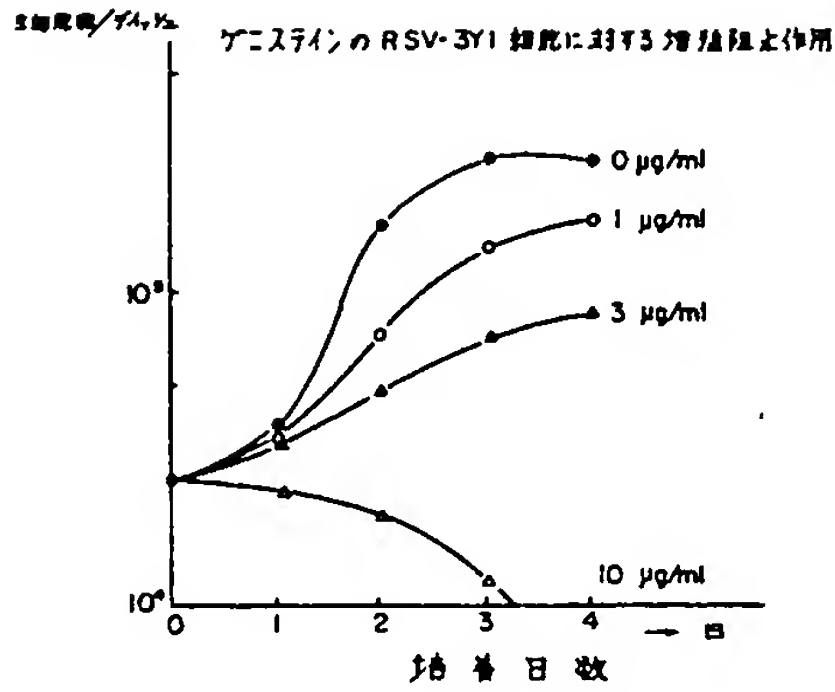
ゲニステインは単独で治療に供されるほか、他の化学療法剤あるいは免疫療法剤と併用される。併用される化学療法剤としては、サイクロホスファミド、ビンブラスチン、ビンクリスチン、アドリアマイシン、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、ブレオマイシン、アクラシノマイシン、ネオカルチノスタチン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、アクチノマイシンD、ニトロソウレア系薬剤等が挙げられる。

キシル剤であってもよく、これらは通常の方法で調製される。直腸投与のためには、坐剤用組成物として提供され、基剤としては、通常用いられるもの、たとえばポリエチレングリコール、ラノリン、カカオ脂、ウイテプゾル®（ダイナミットノーベル社）等を使用できる。

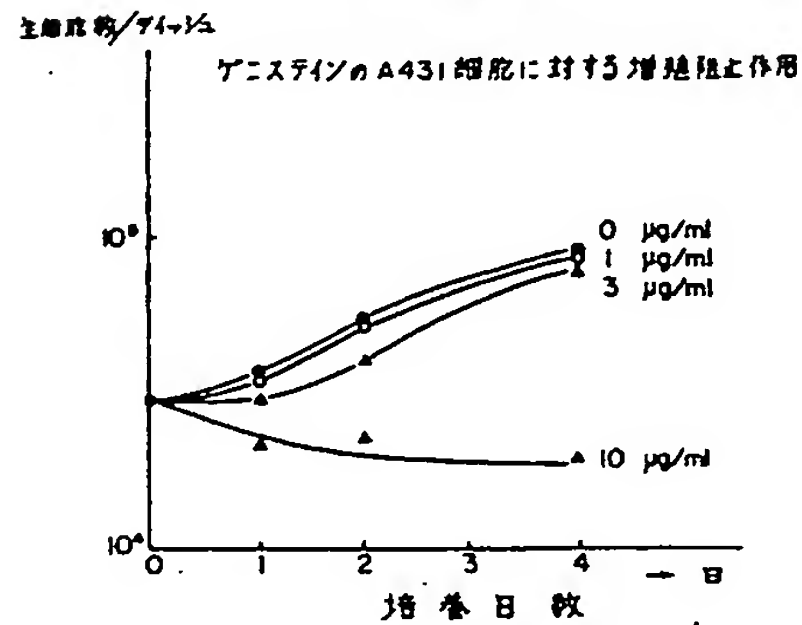
4. 図面の簡単な説明

- (1) 第1図(i), (ii)および(iii)はゲニステインのRSV-3Y1細胞、A431細胞およびSV40-3Y1細胞に対する増殖阻止作用を示す。
- (2) 第2図はゲニステインのP815およびEL-4細胞に対するDNA合成阻止作用を示す。

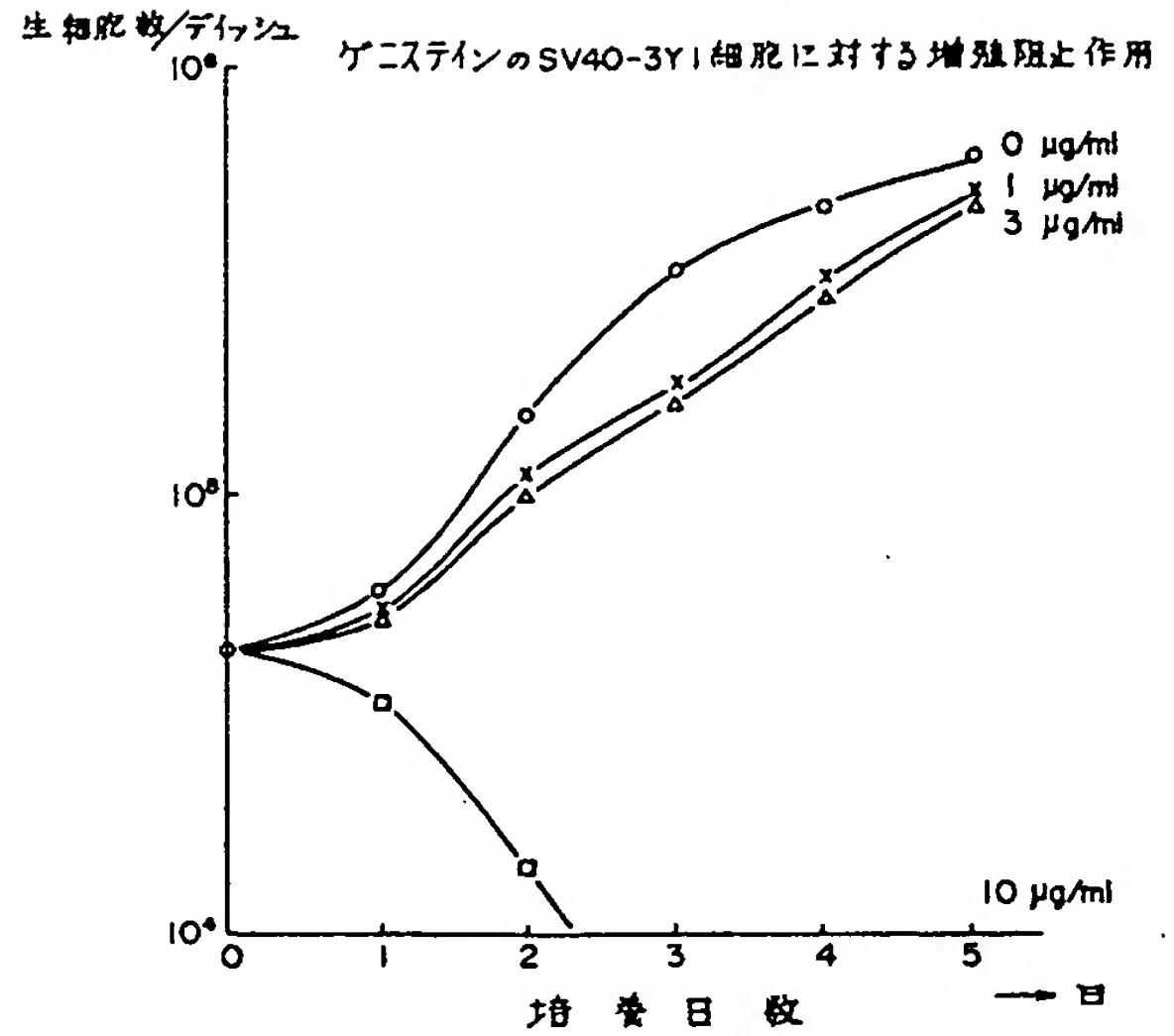
第1図(イ)



第1図(ロ)



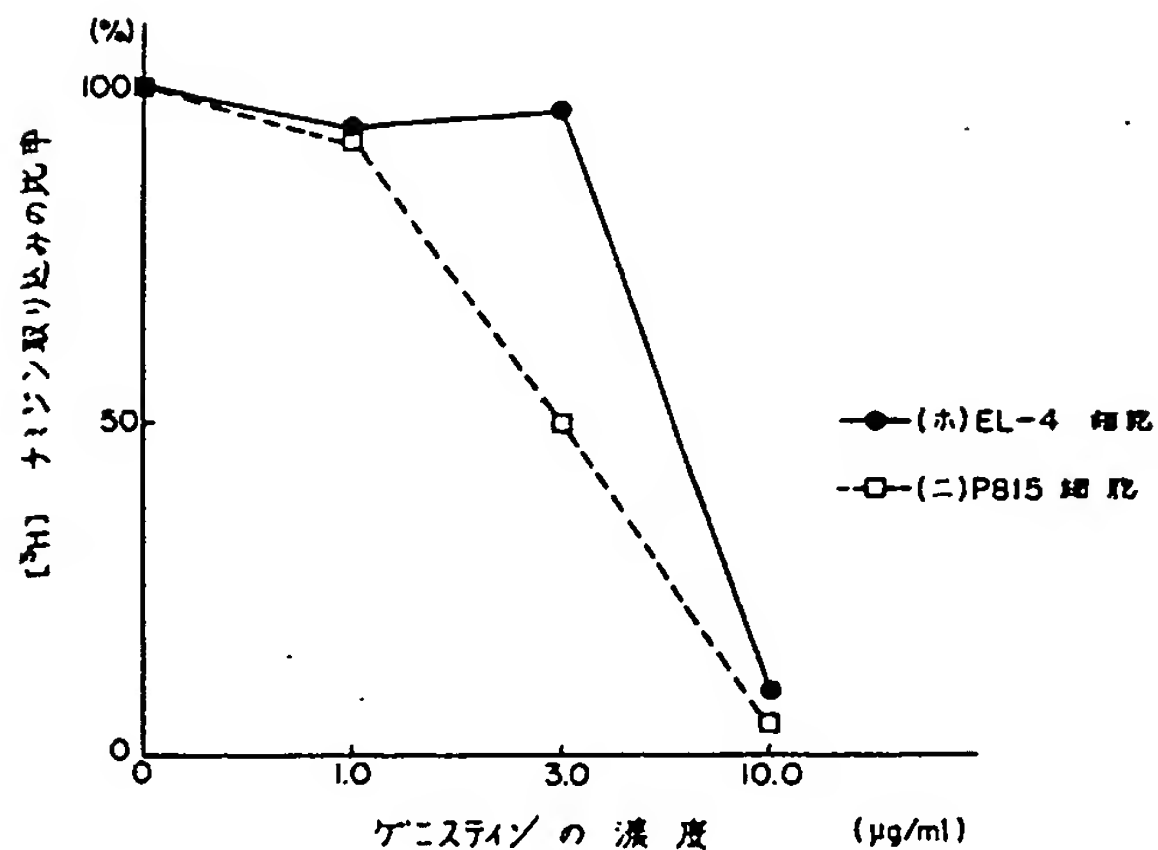
第1図(ハ)



手続補正書(自発)

第2図

昭和60年5月23日



特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第89770号

2. 発明の名称

制癌剤

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住 所 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目5番地1

名 称 (667) 山之内製薬株式会社

代表者 森 岡 茂 夫 (他1名)

4. 代理人

住 所 〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号

山之内製薬株式会社 特許部内

氏 名 (9094) 藤 野 沼 也 (他1名)

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

別紙の通り



方 試 査 (杉本)

- (1) 明細書第4頁第2行「(イ)～(ロ)」を「(イ)～(ハ)」に訂正する。
- (2) 明細書第6頁第3行「Src」とあるを「src」に訂正する。
- (3) 明細書第7頁2行、「Src」とあるを、「src」に訂正する。
- (4) 明細書第8頁第10行「反応して」を「反応させて」に訂正する。
- (5) 明細書第9頁7行「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (6) 同頁下から第1行、「調整」とあるを、「調製」に訂正する。
- (7) 明細書第10頁8行、「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (8) 明細書第11頁3行、「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (9) 同頁第10行「反応した。」を「反応させた。」に「口紙」を「濾紙」に訂正する。
- (10) 同頁第11行「口紙」を「濾紙」に訂正する。
- (11) 同頁第11行「で」を削除する。
- (12) 明細書第13頁10行「調整」を「調製」に訂正する。
- (13) 明細書14頁11行「3分間」を「30分間」に訂正する。